

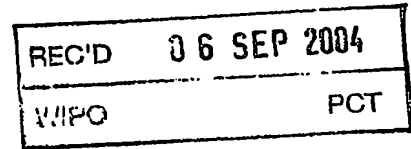
BEST AVAILABLE COPY
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



DE 04/1210



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 25 638.5

Anmeldetag: 6. Juni 2003

Anmelder/Inhaber: Universität Leipzig, 04109 Leipzig/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft
durch Bestimmen von humanem endometrialen Chori-
onionadotropin

IPC: G 01 N 33/53

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 27. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

HeiB

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Frühdiagnostik der Schwangerschaft. Es ist die Aufgabe gestellt, unter Verwendung eines zuverlässigen Testkits frühzeitig ein Schwangerschaft zu diagnostizieren. Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von endometrialem und deziduale hCG aus Heparin- oder EDTA-Plasma und Serum des Peripherblutes in der späten sekretorischen Zyklusphase oder nach ausgebliebener Regelblutung.

Dafür werden spezifische Antikörper mit dem Epitop zum C-terminalen Ende der β hCG-Untereinheit im Exon 3 oder mit einem Epitop im Exon 2 verwendet, die Aminosäuredifferenzen der β hCG-Untereinheit zwischen der hCG-Bildung im endometrialem und trophoblastären Gewebe erkennen und quantifizieren können.

Es wurde gefunden, daß endometriales β hCG vom Gen $\beta 7$, $\beta 6$ und $\beta 6e$ exprimiert wird, während trophoblastäres β hCG vom Gen $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ gebildet wird. Deshalb kann mit einem endometrium- und deziduaspezifischen β hCG-Antikörper eine hCG- und/oder β hCG-Bestimmung erfolgen und eine frühzeitige Aussage über eine Schwangerschaft getroffen werden.

Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Frühdiagnostik einer erfolgten Schwangerschaft durch die Bestimmung von humanem endometrialen hCG und/oder β hCG im Serum, Plasma und im Peripherblut der Lutealphase sowie in der frühen Schwangerschaft. Die Freisetzung des endometrialen hCG ist Ausdruck ungestörter sekretorischer Transformation des Endometriums bzw. Ausdruck einer erfolgten Differenzierung zur Dezipua.

Die Erfindung betrifft ferner einen Testkit zur Durchführung des Verfahrens.

Es ist bereits bekannt, das trophoblastäre Gesamtmolekül hCG (Total-hCG) allein oder in der Summe mit den freien Untereinheiten zu bestimmen. Dafür sind unterschiedliche Testkits vorgeschlagen worden, die mit unterschiedlicher Spezifität arbeiten (1) und die Bestimmung von holo-hCG (Total-hCG), β hCG und β CG ermöglichen (2). Die Heterogenität des hCG im biologischen Material (intaktes α , β -Heterodimer, freies β CG, freies β hCG, β hCG core-Fragment, nicked hCG, nicked β hCG), bezogen auf die Bindung an den jeweilig verwendeten Antikörper, erschweren die genaue Bestimmung und die Standardisierung eines Nachweisverfahrens für das endometriale hCG (3-5). Eine zusätzliche Heterogenität der hCG-Bestimmung in der späten Lutealphase und frühen Schwangerschaft kann im geringen Grad auch zwischen den vier nativen, hyperglykosylierten oder desialylierten Kohlenhydratseitenketten des C-terminalen Endes (CTP) von β hCG (Aminosäure 113 - 145), wie sie different zwischen früher und mittlerer Schwangerschaft und bei Chorioncarcinom im trophoblastären β hCG beobachtet worden sind, auftreten (4, 6-10).

Weiterhin kann die Variation des Alanin, A (Endometrium, Dezidua) und Aspartat, D (Trophoblast) in der Aminosäureposition 117 des C-terminalen Endes von hCG (β hCG-CTP) bei endometrialem, deziduaalem, blastozytärem und trophoblastärem β hCG für die Epitop-Spezifität des verwendeten Antikörpers von Bedeutung sein (11).

Neben der bekannten Änderung der Aminosäuresequenz in Position 117 des CTP vom Exon 3 des β hCG für nicht-trophoblastäres hCG haben wir eine weitere Differenz der Aminosäure bei Position 4 im Exon 2 zwischen Trophoblast und Endometrium finden können (Pro - Met, P - M).

Die bisher etablierten Verfahren haben den Nachteil, keine ausreichende Aussage über die Differenziertheit der exprimierten hCG-Gene treffen zu können. Das hat seine Ursache darin, daß die Verfahren die Heterogenität der vorliegenden β hCG-Epitope aus jeweils endometrialem, trophoblastärem, leukozytärem oder chorioncarcinomähnlichen Ursprung nicht erfassen.

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Bestimmung von humanem endometrialem hCG und/oder β hCG anzugeben, das eine frühzeitige Diagnose einer erfolgten Schwangerschaft ermöglicht.

Die Erfindung hat folgende Aufgabe zu lösen:

- frühzeitige Diagnostik einer Schwangerschaft in Kombination von endometrialem und trophoblastärem hCG,
- Differenzierung eines early pregnancy loss,
- Differenzierung zwischen Extrauterin gravidität und intrauteriner Schwangerschaft,

Das Verfahren richtet sich auf die Angabe einer Schrittfolge zur Bestimmung von endometrialem hCG und/oder β hCG ($e\beta$ hCG), womit die angegebene Zielfunktion erreicht werden kann.

Der Erfindung liegt die wissenschaftlichen Erkenntnisse zugrunde, daß im sekretorischen Endometrium gesunder nichtschwangerer Frauen epitheliales hCG und/oder β hCG gebildet wird (12-15). Auch in der Dezidua wird bei Patientinnen mit Extrauterin gravidität hCG und/oder β hCG im Drüsenepithel nachgewiesen (16). Der Nachweis erfolgt durch Immunhistochemie, in situ-Hybridisierung, Western Blot und RT-PCR.

Nach Sequenzierung wurde von uns nachgewiesen, daß die β -Untereinheit des endometrialen hCG (e β hCG) different zum herkömmlichen trophoblastären hCG (t β hCG) ist, vor allem im Promotorgen des Exon 1 und auch im Exon 3. Das zeigt, daß das e β hCG vom Gen 7 und 6 translatiert wird, während trophoblastäres β hCG vorwiegend vom Gen 5 und auch Gen 8 und 3 gebildet wird.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß das erste in der Frühschwangerschaft nachgewiesene Serum β CG entgegen der allgemeinen Auffassung nicht t β CG sondern e β CG ist. Die Aminosäure- und Nukleotidsequenz des endometrialen β CG wird hier erstmals in SEQ ID No 5 und SEQ ID No 7 dargestellt (Endo). Da die Aminosäure- und Nukleotidsequenz des endometrialen hCG in SEQ ID No 5 und No 7 nicht ausschließlich hCG β 7 oder hCG β 6 ist, bezeichnen wir die endometriale Gensequenz als Gen β 6e.

Die Erfindung vermeidet die Nachteile bisher bekannter Methoden und der zu der Durchführung entwickelten Testkits der Total-hCG/ β hCG-Bestimmung durch den Einsatz des endometrium- und deziduaepithel-spezifischen e β hCG-Antikörpers im Verfahren des Testansatzes.

Es werden spezifische Antikörper mit veränderter Aminosäuresequenz im Exon 2 (Position +4) und Exon 3 (Position +117) entwickelt und eingesetzt, die nur den endometrialen hCG- und/oder β hCG-Anteil im Serum, Plasma und Peripherblut erfassen.

Der Anteil endometrialen hCGs (oder seines β hCG-Anteils) kann durch die Anwendung der beschriebenen Methode mit dem von uns hergestellten spezifischen Antikörper für e β hCG zu hCG anderen Ursprungs differenziert werden, wie zum Beispiel dem trophoblastären hCG (Schwangerschaft). Die Differenz aus den gemessenen hCG-Werten im Peripherblut, das zum Beispiel mit den herkömmlichen total-hCG / β hCG-Immunoassays erfaßt wird, und dem endometrialen hCG im Serum ergibt somit das trophoblastäre hCG. Die Differenz aus dem im Peripherblut gemessenen hCG und dem trophoblastären hCG ergibt das von uns beschriebene e β hCG.

Es ist zu verfahren wie im Patentanspruch 1 dargestellt. Die Erfindung wird nachste-

hend an drei Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiel 1:

Der Patientin wird zur Diagnostik Peripherblut der mittleren bis späten Sekretionsphase entnommen (Heparinblut, Blut). Das Plasma oder Serum wird bis zur Messung bei -20° C gelagert.

Als Antigenmaterial für die Antikörpergewinnung des endometrialen hCG und/oder β hCG werden zum einen je ein synthetisches Peptid der Aminosäuresequenz 109 - 118 oder 109 - 122 oder sequenzversetzt für das hCG β 7, β 6 und hCG β 5, β 8, β 3 des C-terminalen Endes (CTP) im Exon 3 eingesetzt:

ehCG β 7, β 6, β 6e (AS 109 - 122):

109	110				115		117			120		122
Thr	- Cys	- Asp	- Asp	- Pro	- Arg	- Phe	- Gln	- Ala	- Ser	- Ser	- Ser	- Lys

thCG β 5, β 8, β 3 (AS 109 - 122):

109	110				115		117			120		122
Thr	- Cys	- Asp	- Asp	- Pro	- Arg	- Phe	- Gln	- Asp	- Ser	- Ser	- Ser	- Lys

und weiterhin eine Zell-Linie humaner endometrialer Drüsenepithel-Zellen wie RL95-2 oder eine andere Zell-Linie (humane uterine epitheliale Zell-Linie RL 95-2).

Vor dem Einsatz der endometrialen Epithelzellen wird die mRNA-Expression des hCG β 7, β 6, β 6e im Promotorgen Exon 1 und im Exon 3 (CTP) in den nativen Zellen und nach Kultur mit RT-PCR geprüft und durch Sequenzanalyse bestätigt.

Die monoklonalen Antikörper der CTP-Peptide und der Endometrium-Epithel-Zell-Linie gegen hCG β 7, β 6 werden nach Immunisierung, Isolierung, Hybridisierung und Fein-

reinigung in vorgegebener Vorschrift hergestellt und bei - 20° C gelagert. Dazu werden zunächst sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse mit einer Endometrium-Epithel-Zell-Linie immunisiert. Aus den Milzen derart immunisierter Mäuse werden die Zellen isoliert und mit Mausmyelomzellen fusioniert. Die geeigneten Myelomzellen P3-X63-Ag8.653 (17) werden in RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum gezüchtet. In einem Kulturmedium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (18), werden die gebildeten Hybridzellen von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt und Zellklone selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren. Die Selektierung der Hybridome erfolgt in an sich bekannter Weise, ein besonders produktives Hybridom wird ausgewählt. Die Herstellung von Hybridomen, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren, ist zuverlässig wiederholbar. Eine Hinterlegung ist deshalb nicht erforderlich.

Sandwich-ELISA: Die gereinigten monoklonalen Antikörper (Mab) werden an ELISA-plates (96 wells) adsorbiert (8 µg/ml in PBS, 1 Stunde, 37° C) mit anschließendem Blocken und Waschen; Antigeninkubation (100 µl, 1 Stunde, 37° C) mit hCG und/oder βhCG oder dem synthetischen Peptid hCG β7, β6, β6e als Standardreihe und dem Heparinplasma in Blocking-Puffer; Bestimmung des Sandwich-Mab, gekoppelt an HRP type IV (Sigma) zu 100 µl für 1 Stunde, 37° C nach der Methode von Wilson und Nakane (19).

Peripherblut der Frühschwangerschaft: Es wird als Heparin- oder EDTA-Plasma und im Serum zur Messung mit dem direkten hCG β7, β6, β6e-CTP- ELISA (AS 109 – 118; AS 109 -122) bzw. dem hCG β7, β6, β62 (AS -5 bis +5; AS -6 bis +6)-Elisa eingesetzt.

Ausführungsbeispiel 2:

Neben der bekannten Änderung der Aminosäuresequenz in Position 117 des CTP vom Exon 3 des βhCG für nicht-trophoblastäres hCG haben wir eine weitere Differenz der Aminosäure bei Position 4 im Exon 2 zwischen Trophoblast und Endometrium finden können (Pro - Met, P - M).

6

-6 -5 -1 +1 +4 +5 +6

Met - Gly - Gly - Thr - Trp - Ala - Ser - Lys - Glu - Met - Leu - Arg

Met - Gly - Gly - Thr - Trp - Ala - Ser - Lys - Glu - **Pro** - Leu - Arg

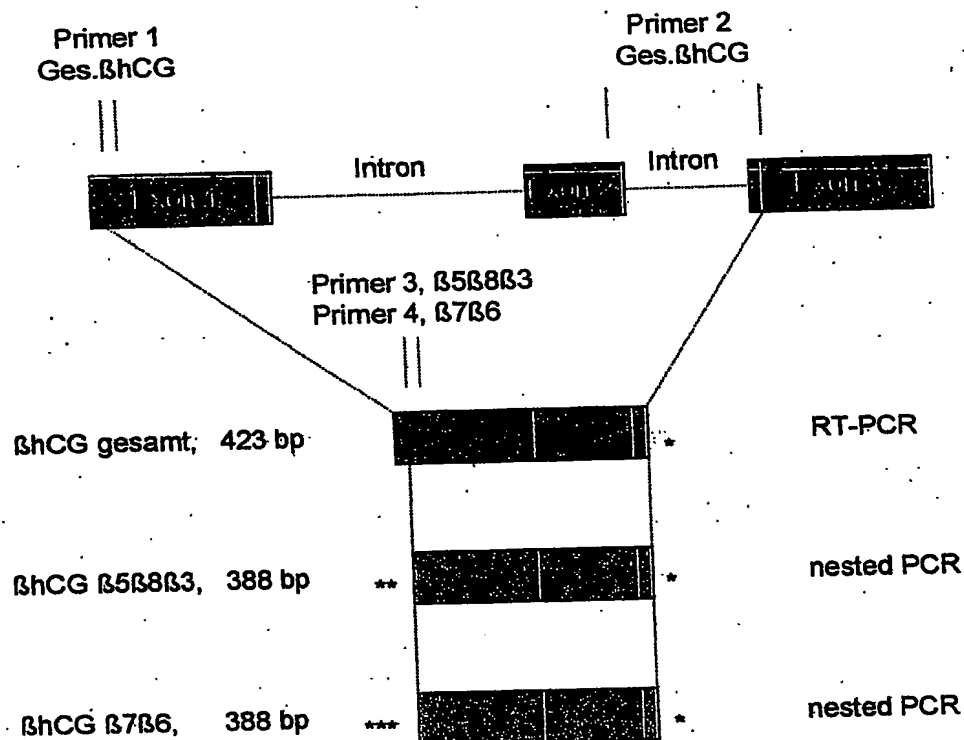
Die monoklonalen Antikörper werden weiter wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben hergestellt und in den beschriebenen ELISA-Test-Anordnungen eingesetzt. Außerdem besteht die Option in Kombination von Ausführungsbeispiel 1 und Ausführungsbeispiel 2 die gesamte Aminosäuresequenz von -4 bis +122 oder eine Ligation mit beiden angegebenen Aminosäuresequenzen als Antigen für die Antikörpergewinnung zu benutzen (sowohl für Aminosäuresequenz ehCG β 7, β 6 als auch thCG β 5, β 8, β 3).

Patentansprüche:

1. *Verfahren* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft im aktuellen Menstruationszyklus durch Bestimmen von humanem endometrialem resp. dezidualem hCG, dadurch gekennzeichnet, daß der Patientin Peripherblut in der späten Sekretionsphase oder nach ausgebliebener Regelblutung entnommen wird, ein ELISA-Test mit dem von aus einer *Endometrium-Epithel-Zelllinie* und einer Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 erhaltenen Hybridom produzierten monoklonalen Antikörper gegen endometriales hCG vorgenommen wird und die Konzentration des endometrialen hCG absolut oder relativ zum Meßwert in einem zweiten ELISA-Test für übliches trophoblastäres hCG bestimmt wird.
2. *Verfahren* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen hCG, dadurch gekennzeichnet, daß je ein ELISA-Test mit synthetischen Peptiden von Exon 3 mit AS 109 bis 122, von Exon 2 mit AS -6 bis +6 oder auch von synthetischen Peptiden mit Anteilen innerhalb der Aminosäuresequenz -6 bis +122, in allen Fällen auch sequenzversetzt oder amino-säureverlängert, dargestellt und zur Messung des endometrialen hCG verwendet wird unter Nutzung der Sequenzen SEQ ID No 1 - 5.
3. *Testkit* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft, bestehend aus einem Enzymimmunoassay zum Bestimmen von humanem endometrialen hCG im Serum/Plasma und einem monoklonalen Antikörper, produziert von einem Hybridom, das aus einer Endometrium-Epithel-Zell-Linie und der Myelomzell-Linie P3X63-Ag8.653 erhalten wird.
4. *Testkit* zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft, bestehend aus einem Enzymimmunassay zum Bestimmen von humanem endometrialen hCG im Serum/Plasma und einem monoklonalen Antikörper, produziert von einem Hybridom, das hergestellt wird durch Immunisierung von sechs bis acht Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäuse mit einer Endometrium-Epithel-Zell-Linie, Isolierung der entsprechenden Zellen aus den Milzen der Mäuse und Fusionierung mit einer Mausmyelomzelllinie, Klonierung und Subklonierung der Hybridome und Verwendung eines produktiven Klons, der die monoklonalen Antikörper in vivo oder in vitro produziert.

5. Verwendung des endometrialen und dezidualen Gens hCG β 6e in Verbindung mit hCG β 7, β 6 für die Transkription und Translation des endometrialen β hCG hinsichtlich der Entwicklung von entsprechenden Nukleotid-Primern für RT-PCR und synthetischen Peptid-Antigenen für die Antikörpergewinnung.
6. Aminosäuresequenz hCG β 6e laut SEQ ID No 5 und Gensequenz hCG β 6e laut SEQ ID No 7.

12



Fluoreszenzmarker: * NED, ** HEX, ***6-FAM

Zitierte Nicht-Patent-Literatur:

- (1) L.A.Cole, *Clin.Chem.*, **43** (1997) 2233-2243
- (2) P.Berger, C.Sturgeon, J.M.Bidart et al., *Tumor Biol.*, **23** (2001) 1-38
- (3) L.A.Cole, *J. Reprod. Med.*, **43** (1998) 3-10
- (4) L.A.Cole, K.M.Rinne, S.Shahabi et al., *Clin. Chem.*, **45** (1999) 313-314
- (5) A.Kardana, M.M.Elliot, M.A.Gawinowicz et al., *Endocrinology*, **129** (1991) 1541-1550
- (6) S.Birken, A.Krichevsky, J.O'Connor et al., *Endocrine*, **10** (1999) 137-144
- (7) A.Krichevsky, S.Birken, J.O'Connor et al., *Endocrinology*, **134** (1994) 1139-1145
- (8) G.Kovalevskaya, S.Birken, T.Kakuma et al., *J. Endocrinol.*, **161** (2000) 99-109
- (9) P.Mock, G.Kovalevskaya, J.F.O'Connor et al., *Hum. Reprod.*, **15** (2000) 2209-2214
- (10) P.Mock, P.Bischof, R.Rivest et al., *Hum. Reprod.*, **13** (1998) 2629-2632
- (11) D.Bellet, V.Lazar, J.Bieche et al., *Cancer Res.*, **57** (1997) 516-523
- (12) H.Alexander, C.Biesold, W.Weber et al., *Zentralbl. Gynäkol.*, **119** (1997) 17-22
- (13) H.Alexander, G.Zimmermann, G.W.Wolkersdörfer et al., *Hum.Reprod. Update*, **4** (1998) 550-559
- (14) H.Alexander, G.Zimmermann, C.Biesold et al., *J.Fertil.Reprod.(SH)*, **2** (1999) 28-37
- (15) G.W.Wolkersdörfer, S.R.Börnstein, G.Zimmermann et al., *Mol.Hum.Reprod.*, **4** (1998) 179-184
- (16) G.Zimmermann, D.Baier, J.Majer et al., *Mol.Hum.Reprod.*, **9** (2003) 81-89
- (17) J.F.Kearney A.Radbruch, B.Liesegang et al., *J.Immunol.*, **123** (1979) 1548-1550
- (18) J.W.Littlefield et al., *Science*, **145** (1964) 709-712
- (19) M.B.Wilson and P.Nakane, in W.Knapp (ed.): *Immunofluorescence and related techniques*, Amsterdam 1978, pp. 215-224

Sequenzprotokoll:

SEQ ID NO 1

- <110> Universität Leipzig
- <120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
- <130> endometriales hCG β 7, β 6, β 6e / C-terminales Ende CTP / AS 109 -122
- <160> 7
- <210> 1
- <211> 14
- <212> Peptid
- <213> β hCG endometrial, CTP, Exon 3
- <220>
- <221>
- <300>
- <301>
- <302>
- <303>
- <304>
- <305>
- <306>
- <307>
- <308>
- <400> 1 (ehCG β 7, β 6, β 6e ; Aminosäure 109 - 122).

1

5

10

14

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Ala Ser Ser Ser Ser Lys

SEQ ID NO 2

- <110> Universität Leipzig
- <120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
- <130> trophoblastäres hCG β 5, β 8, β 3 / C-terminales Ende CTP / AS 109 - 122
- <160> 7
- <210> 2
- <211> 14
- <212> Peptid
- <213> β hCG trophoblastär, CTP, Exon 3
- <220>
- <221>
- <300>
- <301>
- <302>
- <303>
- <304>
- <305>
- <306>
- <307>
- <308>
- <400> 2 (thCG β 5, β 8, β 3; Aminosäure 109 - 122)

1 5 10 14
Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys

SEQ ID NO 3

- <110> Universität Leipzig
- <120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
- <130> endometriales hCG β 7, β 6, β 6e / AS -6 bis +6
- <160> 7
- <210> 3
- <211> 12
- <212> Peptid
- <213> β hCG endometrial, Exon 2
- <220>
- <221>
- <300>
- <301>
- <302>
- <303>
- <304>
- <305>
- <306>
- <307>
- <308>
- <400> 3 (ehCG β 7, β 6, β 6e; Aminosäure -6 bis +6)

1 5 10 12
Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Met Leu Arg

SEQ ID NO 4

- <110> Universität Leipzig
- <120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen
von humanem endometrialen Choriongonadotropin
- <130> trophoblastäres hCG β 5, β 8, β 3 / AS -6 bis +6
- <160> 7
- <210> 4
- <211> 12
- <212> *Peptid*
- <213> β hCG trophoblastär, Exon 2
- <220>
- <221>
- <300>
- <301>
- <302>
- <303>
- <304>
- <305>
- <306>
- <307>
- <308>
- <400> 4 (thCG β 5, β 8, β 3; Aminosäure -6 bis +6)

1 5 10 12
Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu **Pro** Leu Arg

SEQ ID No 5

<110>	Universität Leipzig
<120>	Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
<130>	
<160>	7
<210>	5
<211>	165
<212>	Peptid
<213>	βhCG β6e (eβhCG Endo, Endometrium)
<220>	
<221>	
<300>	
<301>	
<302>	
<400>	5 (βhCG β6e , Aminosäure-Sequenz des Gens im Endometrium)

														-20 Met.
				-15					-10					-5
Glu	Met	Phe	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Gly
			-1		+1				5					10
Gly	Thr	Trp	Ala	...	Ser	Lys	Glu	Met	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg
			15						20					25
Pro	Ile	Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Val
			30						35					40
Cys	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr
			45						50					55
Met	Met	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Gln	Val
			60						65					70
Val	Cys	Asn	Tyr	Arg	Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro
			75						80					85
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Val	Val	Ser	Tyr	Ala	Val	Ala
			90						95					100
Leu	Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Leu	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Cys
			105						110					115
Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe
			120						125					130
Gln	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser
			135						140					145
Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln

SEQ ID No 6

<110>	Universität Leipzig
<120>	Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
<130>	
<160>	7
<210>	6
<211>	165
<212>	Peptid
<213>	βhCG β5, β8, β3 (tβhCG, Trophoblast)
<220>	
<221>	
<300>	
<301>	
<302>	
<400>	6 (βhCG β5, β8, β3, Aminosäure-Sequenz des Gens im Trophoblast)

															-20
															Met
															-15
															-10
Glu	Met	Phe	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	-5
															-1
															+1
															5
Gly	Thr	Trp	Ala	...	Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg	10
															15
															20
Pro	Ile	Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Val	25
															30
															35
Cys	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr	40
															45
															50
Met	Met	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Gln	Val	55
															60
															65
Val	Cys	Asn	Tyr	Arg	Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro	70
															75
															80
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Val	Val	Ser	Tyr	Ala	Val	Ala	85
															90
															95
Leu	Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Leu	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Cys	100
															105
															110
Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe	115
															120
															125
Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	130
															135
															140
Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln	145

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zur Frühdiagnostik einer Schwangerschaft durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropins

<130>

<160> 7

<210> 7

<211> 861

<212> DNA

<213> β hCG β 6e (e β hCG Endo, Endometrium)

<221>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 7 (β hCG β 6e, Sequenz des Gens im Endometrium)

agcactttcc	tcgggtcacg	gcctcctcct	ggttcccaag	accccacccat	aggcagagggc	60
aggccttcct	acaccctact	ctctgtgcct	ccagcctcga	ctagtcccta	gcactcgacg	120
actgagtctc	agaggtcact	tcaccgtggt	ctccgcctca	tccttgggcg	tagaccactg	180
aggggagagg	actgggggtg	tccgctgagc	cactectgtg	cctccctggc	cttgtctact	240
tctcgcccc	cgaagggtta	gtgtccagct	cactccagca	tectacaacc	tcctgggtggc	300
cttgccgccc	ccacaaaccc	gaggtataaa	gccaggtaca	ccaggcaggg	gacgcaccaa	360
ggatggagat	gttccagggg	ctgctgctgt	tgctgctgct	gagcatgggc	gggacatggg	420
catccaagga	gatgcttcgg	ccacgggtgc	gccccatcaa	tgccaccctg	gctgtggaga	480
aggagggctg	cccggtgtgc	atcacccgtca	acaccacccat	ctgtgccggc	tactgccccca	540
ccatgacccg	cgtgctgcag	ggggtcctgc	cggccctgcc	tcaggtgggtg	tgcaactacc	600
gcatgtgctg	cttcgagtc	atccggctcc	ctggctgccc	gcgcggcgtg	aaccccgctg	660
tctctacgc	cgtggctctc	agctgtcaat	gtgactctg	ccgccgcagc	accactgact	720
gcgggggtcc	caaggaccac	cccttgacct	gtgatgacct	ccgcttcag	gcctcctctt	780
cctcaaaggg	ccctccccc	agccttccaa	gtccatcccg	actcccgggg	ccctcggaca	840
ccccgatcct	cccacaataa	a				861

-360

-300

-240

-180

-120

-60

```
LH                                     leu
hCG                                met glu met phe gln ***** Intron *****
LH4      A          G              T                      C
CG5      GTA CAC   CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG GTA AGA CTG CAG ... ..
CG6      GTA CAC   CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG
CG7      GTA CAC   CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG
Endo     GTA CAC   CAG GCA GGG GAC GCA CCA AGG ATG GAG ATG TTC CAG
                    -1 +1                               +15
```

LH
hCG *** ** gly leu leu leu leu leu leu leu ser met gly gly thr trp ala
LH4
CG5 ... TTG TCC CAG GGG CTG CTG CTG TTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
CG6
CG7
Endo GGG CTG CTG CTG TTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
+16 +30 +60

LH 1 arg 4 trp 10 his 20 ile
hCG ser lys glu pro leu arg pro arg cys arg pro ile asn ala thr leu ala val glu lys
LH4 G CCG T A
CG5 TCC AAG GAG CCG CTT CGG CCA CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG
CG6 A CCA C G
CG7 A ATG C G
Endo TCC AAG GAG ATG CTT CGG CCA CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG
met +90 +120

LH 21 30 40
hCG glu gly cys pro val cys ile thr val asn thr thr ile cys ala gly tyr cys pro thr
LH4
CG5 GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC
CG6
CG7
Endo GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC
+150 +180

LH 41 42
hCG met *** ** Intron *** ** met
LH4
CG5 GTG AGC TGC CCG GGG CCG ... CCC CAC TCA CAC GGC TTC CAG
CG6
CG7
Endo ATG
+183 +186

LH 50 60
hCG arg val leu gln gly val leu pro pro ala leu pro gln val val cys thr asn tyr arg asp val
LH4 C C
CG5 GGG GTC CTG CCG GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC AAC TAC CGC GAT GTG
CG6 G G
CG7 G A
Endo CGC GTG CTG CAG GGG GTC CTG CCG GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC AAC TAC CGC GAT GTG
+210 +240

LH 70 80
hCG arg phe glu ser ile arg leu pro gly cys pro arg gly val asp phe
LH4 T G
CG5 CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC
CG6 C A
CG7 C A
Endo CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC
+270 +300

90 100
 LH pro arg pro ser
 hCG ala val ala leu ser cys gln cys ala leu cys arg arg ser thr thr asp cys gly gly
 LH4 C T GC G C T T
 CG5 GCC GTG GCT CTC AGC TGT CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC AGC ACC ACT.GAC TGC GGG GGT
 CG6 G C AA C A C
 CG7 G C AA C A C
 Endo GCC GTG GCT CTC AGC TGT CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC AGC ACC ACT GAC TGC GGG GGT
 +330 +360

110 117 120
 LH his glu leu ser gly leu leu phe leu ser
 hCG pro lys asp his pro leu thr cys asp asp pro arg phe gln asp ser ser ser ser lys
 LH4 A C C CAAC TCT CAG GCC TCC TCT TCC TCT AAA
 CG5 CCC AAG GAC CAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CG-C TTC CAG GAC TCC TCT TCC TCA AAG
 CG6 G T G C
 CG7 G T G C
 Endo CCC AAG GAC CAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CG C TTC CAG GCC TCC TCT TCC TCA AAG
 +390 ala +420

130 140
 hCG ala pro pro pro ser leu pro ser pro ser arg leu pro gly pro ser asp thr pro ile
 LH4 A
 CG5 GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC
 CG6 C
 CG7 C
 Endo GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC
 +450 +480

145
 hCG leu pro gln ter
 LH4
 CG5 CTC CCA CAA TAAA
 CG6
 CG7
 Endo CTC CCA CAA
 +495

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.